



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Gebrauchsmusterschrift
⑯ DE 201 11 022 U 1

⑮ Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/48
B 01 L 3/00
C 12 Q 1/68

⑯ Aktenzeichen: 201 11 022.9
⑯ Anmeldetag: 29. 6. 2001
⑯ Eintragungstag: 4. 10. 2001
⑯ Bekanntmachung im Patentblatt: 8. 11. 2001

DE 201 11 022 U 1

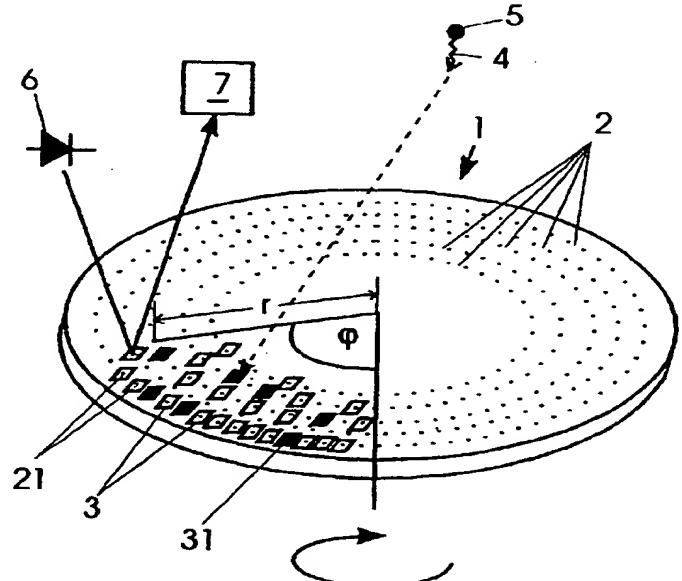
⑯ Innere Priorität:
100 33 360.5 01.07.2000

⑯ Inhaber:
Institut für Physikalische Hochtechnologie e.V.,
07745 Jena, DE; Fritzsche, Wolfgang, Dr., 07743
Jena, DE

⑯ Vertreter:
R.-G. Pfeiffer und Kollegen, 07745 Jena

⑯ Probenträger zum Nachweis biologischer oder chemischer Spezies

⑯ Probenträger zum Nachweis biologischer oder chemischer Spezies bestehend aus einem planaren Träger (1), der mit einem in optisch auslesbaren Signalspuren (2) eingeschrieben Standarddatensatz derart versehen ist, daß eine wahlweise vorgebbare Anzahl von fixierten, optisch auslesbaren r-φ-Koordinaten (21) gebildet ist und die Trägeroberfläche weiterhin mit einer vorgebbaren Anzahl einzelner und voneinander zumindest im Raster des eingeschriebenen Standarddatensatzes beabstandeter und den r-φ-Koordinaten (21), oder eines Teils davon, mit definiert zugeordneten Bindungsflächen (3) versehen ist, deren jeweilige Bindungsselektivität in Abhängigkeit von den an sie zu bindenden Spezies (4), die mit einem reflektierenden oder lichtabsorbierenden oder lichtstreuenden Marker (5) versehen sind, vorgebbar ist, wodurch auf ausgewählten Bindungsflächen (31) reflektierende oder lichtabsorbierende oder Streulicht verursachende Spots gebildet sind.



DE 201 11 022 U 1

Probenträger zum Nachweis biologischer oder chemischer Spezies

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft einen Probenträger zum Nachweis biologischer oder chemischer Spezies, durch Reflexionsauslesung. Die erfindungsgemäße Lösung soll insbesondere für Aufgaben der kombinatorischen Chemie, für diagnostische Aufgaben, wie etwa in der Medizin oder zur Entwicklung neuer Wirkstoffe, z.B. für Medikamente oder selektiv wirkende Pflanzenschutzmittel, Verwendung finden.

Zur Identifikation biologischer Spezies, Individuen und Krankheiten haben sich Nachweise durch Molekül-Molekül-Wechselwirkung als besonders zweckmäßig erwiesen. Die Messung von Bindungsereignissen auf Biochips erfolgt dabei in der Regel unter Verwendung von Fluoreszenzmarkern. Die Detektion von Bindungsereignissen insbesondere auf hochintegrierten Biochips mit kleinen Bindeflächen durch Fluoreszenzmessung ist zeitaufwendig und nur mit teuren optischen Einrichtungen für die Auslesung zu bewerkstelligen. Die für quantitative Messungen erforderlichen längeren Expositions- und Akkumulationszeiten bewirken zudem eine photochemische Degradation der Farbstoffe, die das Signal im Verlauf der Messung verschlechtert und die Quantifizierung erschwert. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes pro Anregungslichtmenge und Bindeereignis hängt zudem von der spezifischen chemischen Umgebung der zum Markieren verwendeten Chromophore ab. Deshalb treten von Charge zu Charge und von Test zu Test erhebliche Abweichungen in den Meßsignalen auf, die die eigentlich erforderliche Quantifizierung der Meßsignale ganz erheblich beeinträchtigen.

30

Weiterhin ist es grundsätzlich bekannt, daß funktionalisierte Nanopartikel spezifisch an Biomoleküle angelagert werden können (Nicholl, D., Genetische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1995), S.24-27). Solche Bindeereignisse werden u.a. genutzt, um in der Grundlagenforschung mit Hilfe ultramikroskopischer Techniken wie z.B. Tunnel-, Kraft- und Transmissionselektronenmikroskopie

35

DE 20111022 U1

- sequenzspezifische Informationen auf der Skala von wenigen bis 1 nm aus auf Festkörperoberflächen immobilisierten biogenen Makromolekülen zu gewinnen. Dabei wird der Umstand genutzt, daß einzelne Partikel an diskrete Regionen eines einzelnen großen Moleküls angelagert werden.
- 5 Zum Nachweis dieser einzelnen Partikel sind ultramikroskopische Verfahren unerlässlich. Diese sind aber zu aufwendig, d.h. sowohl in der Investition als auch in der Handhabung zu kompliziert und zu teuer, um für Serien- oder Routineanalysen eingesetzt zu werden.
- 10 Die genannten, in zwei Koordinatenrichtungen scannenden Verfahren zum Nachweis von Bindeereignissen auf Biochips und verwandten Trägern, sind zeitraubend und vergleichsweise kostenintensiv.
- Weiterhin ist aus DE 198 18 999 A1 eine Vorrichtung zur Erzeugung von frei definierbaren Repertoires bekannt, bei der ein Probenträger eingesetzt wird, der auf der Oberseite mit Spots zum Aufbau von Substanzbibliotheken versehen ist, welche bei Rotation des Probenträgers in einer speziell dafür ausgebildeten Vorrichtung durch Bestimmung von Winkelkoordinaten auslesbar sind. Dazu sind auf der Unterseite des Probenträgers zusätzliche, z.B. optisch auslesbare Informationen über die 15 Spotpositionen, Zusammensetzung und Struktur der Bibliothek auf der anderen Probenträgerseite eingeschrieben. Diese Vorrichtung ermöglicht eine gewisse Erhöhung der Auslesung der einzelnen Bibliothekselemente gegenüber konventionellen x-y-Auslesemethoden. Die Auslesegeschwindigkeit ist jedoch dadurch begrenzt, daß ein ständiger Datenvergleich zwischen den ausgelesenen Spots auf der Oberseite des Probenträgers und der Zuordnung zu den Informationen auf der Unterseite des Probenträgers vorgenommen werden muß, um überhaupt eine 20 definierte Zuordnung der Winkelkoordinaten zu den Spots zu gewährleisten.
- 25 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen kostengünstigen Probenträger zum Nachweis von Bindungsergebnissen biologischer oder chemischer Spezies zu schaffen, der auch für hohe Informationsdichten, d.h. bei kurzen Lesezeiten pro Einzelpunkt anwendbar ist und welcher keiner eigens dafür zu schaffenden Auslesevorrichtungen bedarf.
- 30

Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Schutzanspruchs 1 gelöst. Vorteilhafte weitere Ausgestaltungen sind durch die nachgeordneten Ansprüche erfaßt.

- 5 Mit Hilfe vorliegender Erfindung ist, anstelle der nach dem Stand der Technik üblichen zeitlich ungünstigen Auslesung in xy-Richtung, und des zeitlich ebenfalls begrenzten Verfahrens nach DE 198 18 999 A1 ein extrem schnelles Lesen von Informationen von Oberflächen in $r\varphi$ -Koordinaten bei rotierenden Trägern möglich, wie es in der CD-Technik 10 üblich ist. Mit dieser kostengünstigen und verfügbaren Technik können in sehr kurzer Zeit viele Oberflächenelemente angesteuert werden.

Eine besonders kostengünstige Lösung besteht in der Verbindung von dichten Markierungen von Oberflächenspots mit metallischen 15 Nanopartikeln und einer CD-Auslesetechnik. Dazu müssen die chemischen Oberflächenspots auf einer Scheibe analog zu vorgebbaren Speicherpixeln einer CD oder einem ähnlichen Träger, wie z.B. einer Minidisk, angeordnet werden. Wird ein Nanobead-Labeling angewendet, so wird das Reflexionsvermögen der Scheibe lokal geändert. Dieser Effekt entspricht vollständig der lokal unterschiedlichen Reflektivität, die 20 beim Auslesen von Daten in CD-Abspielgeräten oder ähnlichen Geräten genutzt wird. Die erhaltenen Signalfolgen sind überraschenderweise so kontrastreich, daß Bindeereignisse an monomolekularen Schichten und auch weit unterhalb einer geschlossenen monomolekularen Bedeckung 25 allein auf Grund des Reflexionssignals sicher ausgelesen werden können. Sollte auf Grund sehr geringer Lösungskonzentrationen bspw. von Proben-DNA die Dichte der Nanopartikel auf der Oberfläche für eine sichere reflektometrische Auslesung zu klein sein, so liegt es im Rahmen 30 der Erfindung, eine Signalverstärkung durch eine bead-induzierte lokale außenstromlose Abscheidung von Metall (z.B. Silber) zu erreichen.

Je nach chemischer Beschaffenheit liegt die lokale Beladungsdichte mit Nanobeads oberhalb oder unterhalb eines Schwellwertes, der den einzelnen Spot als "L"- oder "0"- Signal wertet. Konzentrationen können 35 anhand von unterschiedlich dicht liegenden komplementären Bindegruppen detektiert werden. Auf diese Weise können für die

DE 201111022 U1

Auslesung von hochintegrierten CD-artigen Spotarray-Trägern konventionelle und sehr preiswert verfügbare CD-Laufwerke oder ähnliche Geräte eingesetzt werden, die zudem leicht in Standard-Rechner integriert werden und mit Standardsoftware betrieben und ausgelesen werden können.

Die Erfahrung soll nachstehend anhand eines schematischen Ausführungsbeispiels näher erläutert werden. Es zeigt:

- 10 Fig. 1 eine Ausführungsmöglichkeit eines Probenträgers und
schematisch dessen Auslesung.

Als planarer Probenträger 1 wird im Beispiel eine übliche CD oder ein ähnlicher Träger eingesetzt, die mit einem in optisch auslesbaren Signalspuren 2 eingeschrieben Standarddatensatz derart versehen ist, daß eine wahlweise vorgebbare Anzahl von fixierten, optisch auslesbaren $r\varphi$ -Koordinaten 21 gebildet ist. Weiterhin ist die selbe Trägeroberfläche 1 mit einer vorgebbaren Anzahl einzelner und voneinander zumindest im Raster des eingeschriebenen Standarddatensatzes beabstandeter und den $r\varphi$ -Koordinaten 21, oder eines Teils davon, wie in Fig. 1 beispielhaft nur in einem Sektor φ angedeutet, mit den den $r\varphi$ -Koordinaten 21 definiert zugeordneten Bindungsflächen 3 versehen. Im Beispiel sind die Bindungsflächen 3 mit Durchmessern oder Längerstreckungen vorteilhaft in der Größenordnung von 0,5 μm bis 500 μm festgelegt, worauf die Erfahrung jedoch nicht beschränkt ist. Prinzipiell kann die Größe der Bindungsflächen bis in den Pixelbereich einer CD festgelegt sein, wenn von einer derartigen Fläche noch ein detektierbares Signal geliefert wird. Die spezielle Art und Ausbildung der Bindungsflächen 3 ist dabei, in Abhängigkeit von den zu detektierenden Bindungereignissen, beliebig vorgebbar und kann entsprechend des Standes der Technik, weshalb hier keine weiteren diesbezüglichen Erläuterungen erforderlich sind, bspw. durch Drucken oder durch Aufspritzen mittels Mikrodosiersystemen erfolgen. An die selektiv bindenden Bindungsflächen 3 koppeln die zu bindenden Spezies 4, die mit einem reflektierenden oder lichtabsorbierenden Marker 5 versehen sind, vorgebbar an, wodurch auf ausgewählten Bindungsflächen 31 reflektierende oder lichtabsorbierende

DE 20111022 U1

oder Streulicht verursachende Spots gebildet sind. Entstehen auf den Bindungsflächen 31 bspw. reflektierende Belegungen, die das Reflexionsvermögen der Scheibe lokal ändern, so können die $r\text{-}\varphi$ -Koordinaten dieser Spots mittels einer Laserdiode 6 und eines Detektors 7 bei Rotation in einem üblichen CD-Abspielgerät als Störung an einer bekannten $r\text{-}\varphi$ -Koordinate ausgelesen werden. Da bei der Herstellung der Bindungsfächen 3 jedoch bekannt ist, welche Spezies 4 allein an diesen Bindungsfächen 31 bindbar sind, ist somit eine direkte Zuordnung zu den gebundenen Spezies 4 möglich. Durch diese Art der Signalgewinnung ist eine erhebliche Steigerung der Auslesegeschwindigkeit des Probenträgers gegeben, die gegenüber herkömmlichen xy-Auslesungen mindestens um den Faktor 2 und bis zum ca. 1000-fachen, je nach Markerdichte, erhöht ist.

In einem speziellen Beispiel sollen 960 Oligonukleotide mit je 8 Basenpaaren spotweise auf der planen Probenträgeroberfläche (CD) immobilisiert sein, so daß jedes Oligonukleotid durch die Koordinaten der Bindungsfächen 3 (Spots) eindeutig zugeordnet werden kann. Die so präparierten Probenträger 1 werden mit einer zu testenden Lösung versetzt, die DNA (Spezies 4) unbekannter Zusammensetzung enthält. Diese bindet nur auf den Bindungsfächen 31, die zu Teilabschnitten der DNA komplementäre Oligos tragen. Nach Abspülen, zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA, wird die Trägeroberfläche mit einer kolloidalen Lösung von Markern 5, im Beispiel Nanogoldpartikeln, mit Durchmessern in der Größenordnung von 2 ... 600 nm, vorzugsweise 15 ... 60 nm (im Beispiel 30 nm), behandelt, deren Oberfläche ein Oligonukleotid trägt, dessen Sequenz so beschaffen ist, daß es nicht komplementär zu einem der Spots auf dem Chip, aber komplementär zu einer (konservativen) Nukleotidabfolge der untersuchten Targetmoleküle 4 ist, die in alle in Frage kommenden Targetmolekülen gleich vorkommt. Nach einer Hybridisierung wurde eine Dichte von ca. 110 Partikeln/ μm^2 erhalten. Durch die Abscheidung der Goldpartikel erhöht sich die Reflektivität in vorher geringer reflektierenden Bindungsbereiche 3.

Für den Fall, daß die Lösungskonzentration der zu detektierenden Spezies zu gering ist, um einen ausreichenden Reflexionsunterschied der Spots 31 zu bewirken, liegt es im Rahmen der Erfindung, den Träger 1 bspw. in ein

Bad zu tauchen, das Ag^+ -Ionen und ein Reduktionsmittel enthält. Nach einer Einwirkungszeit von 20 Minuten wird der Träger 1 aus dem Bad genommen, abgespült und getrocknet. Durch die Metallabscheidung wird lokal die Signalfolge auf dem Träger 1 verändert. Anschließend wird der Träger 1 in einem nicht dargestellten CD-Laufwerk vermessen. Mittels einer Auswertesoftware werden die Koordinaten der durch den chemischen Prozeß im Reflexionsverhalten veränderten Oberflächenbereiche 31 des Trägers 1 ermittelt, und die ursprünglich auf diesen Spots aufgebrachten Oligonukleotide werden diesen $r\text{-}\varphi$ -Koordinaten zugeordnet. Anhand der Verteilung reagierender (Gold-markierten) zu nicht-reagierenden (Gold-freien) Spots kann eineindeutig auf die Sequenz der Proben-DNA (Spezies 4) geschlossen werden.

Durch einen aufwendigeren Eingriff in übliche CD-Abspielsysteme und Anpassung der Auswertesoftware ist es ebenfalls grundsätzlich möglich, lichtabsorbierende oder fluoreszierende oder Streulicht verursachende Spots 31 zu detektieren, wobei auch andere, nach dem Stand der Technik übliche Marker, wie bspw. eingefärbte Polymerkugelchen etc. zum Einsatz gelangen können.

Auch ist es möglich, für den planaren Träger 1 eine transparente Scheibe einzusetzen, die mit einer nichttransparenten Belegung versehen ist, wobei die Belegung im Bereich der vorgegebenen $r\text{-}\varphi$ -Koordinaten des Standarddatensatzes entfernt sind, so daß eine Auslesung des Probenträgers in Transmission erfolgen kann.

Wesentlich ist es im Rahmen der Erfindung, daß sowohl der genannte Standarddatensatz und diesem zugeordnete Bindungsflächen einseitig auf der selben Trägeroberfläche vorgesehen sind.

DE 20111022 U1

Schutzansprüche

1. Probenträger zum Nachweis biologischer oder chemischer Spezies bestehend aus einem planaren Träger (1), der mit einem in optisch auslesbaren Signalspuren (2) eingeschrieben Standarddatensatz derart versehen ist, daß eine wahlweise vorgebbare Anzahl von fixierten, optisch auslesbaren r-φ-Koordinaten (21) gebildet ist und die Trägeroberfläche weiterhin mit einer vorgebbaren Anzahl einzelner und voneinander zumindest im Raster des eingeschriebenen Standarddatensatzes beabstandeter und den r-φ-Koordinaten (21), oder eines Teils davon, mit definiert zugeordneten Bindungsflächen (3) versehen ist, deren jeweilige Bindungsselektivität in Abhängigkeit von den an sie zu bindenden Spezies (4), die mit einem reflektierenden oder lichtabsorbierenden oder lichtstreuenden Marker (5) versehen sind, vorgebar ist, wodurch auf ausgewählten Bindungsflächen (31) reflektierende oder lichtabsorbierende oder Streulicht verursachende Spots gebildet sind.
2. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für den planaren Träger (1) mit dem eingeschriebenen Standarddatensatz eine an sich übliche CD oder ähnlicher Träger eingesetzt ist.
3. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für den planaren Träger (1) eine transparente Scheibe eingesetzt ist, die mit einer nichttransparenten Belegung versehen ist, wobei die Belegung im Bereich der vorgegebenen r-φ-Koordinaten des Standarddatensatzes entfernt ist.
4. Probenträger nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß auf den beabstandeten Bindungsflächen (3) unterschiedliche Oligonukleotide immobilisiert sind.

DE 20111022 U1

DE 29-06-01

- 8 -

- 5 5. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Marker (5) lichtreflektierende metallische Partikel, insbesondere Goldpartikel, mit Durchmessern in der Größenordnung von 2 ... 600 nm, vorzugsweise 15 ... 60 nm, eingesetzt sind.
- 6 10. 6, Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsflächen (3) mit Durchmessern oder Längserstreckungen in der Größenordnung von 0,5 µm bis 500 µm festgelegt sind.
- 15 10. 7. Probenträger nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß metallische Marker eingesetzt werden, welche an den jeweiligen Bindungsflächen selektiv ankoppeln, wobei die gebundenen Marker vor der optischen Auswertung einer stromlosen Metallbeschichtung unterworfen werden, um die Reflektivität der jeweiligen Bindungsflächen zu erhöhen.

DE 20111022 U1

029-06-01

1 / 1

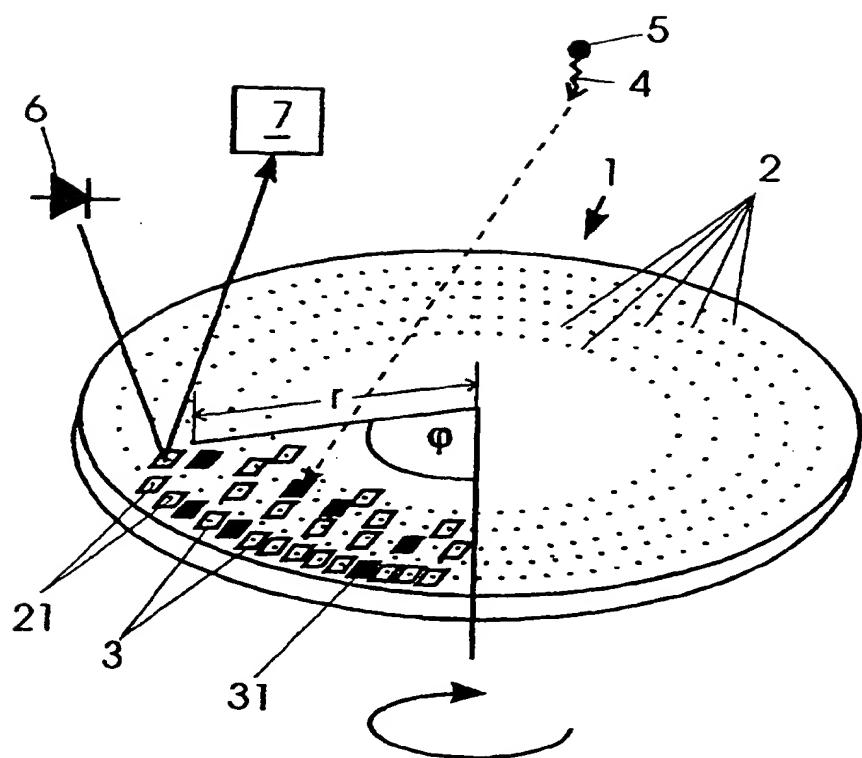


Fig. 1

DE 201 11 022 U1